

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20790573
研究課題名（和文）肺上皮特異的 Pten 欠損マウスを用いた肺線維症病態解析と新規分子標的治療の検討
研究課題名（英文）Investigation of the pathomechanisms of lung fibrosis by using bronchioalveolar epithelium-specific Pten deficient mice
研究代表者
柳 重久 (YANAGI SHIGEHISA)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：60404422

研究成果の概要（和文）：

申請者は、原因不明で有効な治療法がなく、予後不良の疾患である肺線維症の病態を解明するために主に肺上皮特異的 Pten 欠損マウスを用いて研究を行った。その結果、肺上皮での Pten 発現は肺線維症の発症抑制に決定的な役割を有すること、その機序として、Pten は肺線維芽細胞活性化や上皮間葉形質転換の制御に重大な役割を有することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Idiopathic pulmonary fibrosis is a chronic, lethal interstitial lung disease resulting from abnormal wound healing that involves epithelial mesenchymal interaction and epithelial-mesenchymal transition (EMT). To clarify the biological role of PTEN, in bronchioalveolar epithelium in the pathogenesis of lung fibrosis in vivo. KO mice showed high mortality compared with the control after bleomycin administration due to hypoxia caused by aberrant lung fibrosis. Lungs of KO mice exhibited increased accumulation of myofibroblasts and type I collagen. EMT significantly increased in KO mice. These results suggested that bronchioalveolar PTEN expression plays a critical role in preventing lung fibrosis by regulating EMT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺線維症、分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) は、原因不明で慢性進行性の

肺線維化疾患であり、5年生存率は30%弱と予後不良である。IPFは、肺胞上皮傷害とそれに引き続く異常な修復過程である筋線維

芽細胞の増殖と間質への細胞外マトリックスの沈着を特徴とし、正常肺構築を破壊し、最終的に呼吸不全に陥る。また、IPFは高率に肺癌を合併し、IPFの病変部分に肺癌の発生源母地が存在すると推定されるが、その発生機序は不明である。

PTEN(Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten)は、広範な腫瘍で変異がみられる癌抑制遺伝子である。種々の成長因子によって活性化されるPI3キナーゼは、PIP2をリン酸化してPIP3を生成し、Aktを介するシグナル伝達を活性化する。PTENはPIP3を主な基質とする脂質フォスファターゼで、PI3キナーゼの経路を負に制御している。PTENとIPFの関連について、IPF患者肺組織の筋線維芽細胞においてPTEN蛋白の発現減弱を認めること、*in vitro*にて筋線維芽細胞にPTENを過剰発現させると、分化・増殖が抑制されることが報告されているが、これまでに、上皮細胞でのPTENのIPF病態機構に対する役割を生体で明らかにしたものはない。

申請者はPTENの肺上皮細胞での役割を解析するため、*Pten*^{fllox}マウスと細気管支肺胞上皮細胞特異的かつDoxycycline依存的にCreを発現するマウスとを交配し、細気管支肺胞上皮特異的*Pten*欠損マウスを作成した。9割の*Pten*欠損マウスは、肺胞上皮・間質過形成による血液空気閥門肥厚による呼吸不全で出生直後に死亡した。後天的に*Pten*を欠損させたマウスは、生後1.5年までに全例肺腺癌を自然発症した。これらのマウスでは、肺腺癌の起源とされる細気管支肺胞上皮幹細胞(BASC)の細胞数が著しく増加していた。さらに、出生直後の*Pten*欠損マウスにおいて、(1) α -SMA陽性筋線維芽細胞が増殖し、(2)上皮間質細胞増殖因子・癌遺伝子であるShhが過剰発現することを確認している。以上のことから、細気管支肺胞上皮におけるPTENは、主としてShhの発現を制御することで、筋線維芽細胞の分化増殖や、上皮修復機構の制御を介し、IPF発症とIPF合併肺癌発症の制御に重要な役割をもつと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細気管支肺胞上皮特異的*Pten*欠損マウスを用いて、IPFの発症およびIPF合併肺癌発症進展機序の解明と、現在有効な治療法のないIPFに対する新規治療戦略を展開することである。

3. 研究の方法

申請者は、主に肺上皮特異的*Pten*欠損マウスを用いて、肺線維症の発症機序の解明と新規治療法の構築を行うため、以下の研究を行った。

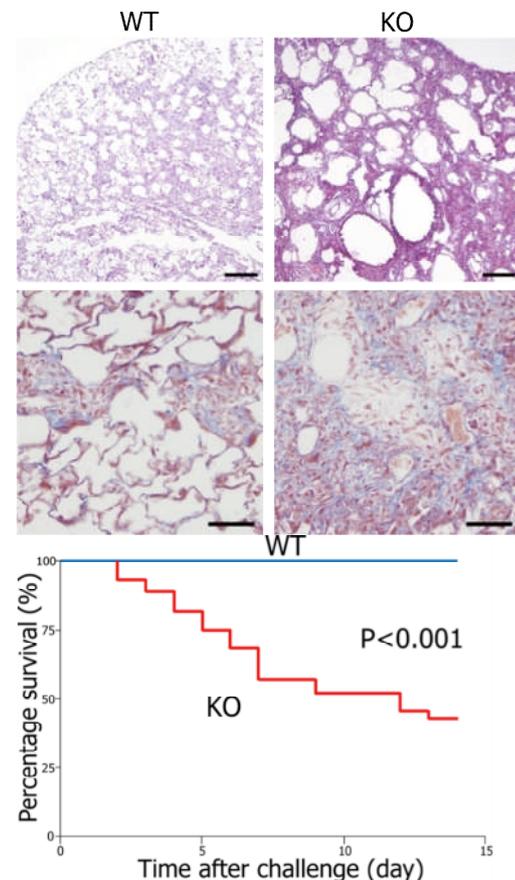
- ① 細気管支肺胞上皮における*Pten*の肺線維症発症制御
- ② 細気管支肺胞上皮*Pten*発現の炎症細胞浸

潤・基底膜破綻・肺線維芽細胞活性に与える影響

- ③ 上皮間葉形質転換(EMT)に対する細気管支肺胞上皮*Pten*の役割
 - ④ 細気管支肺胞上皮*Pten*発現のTGF- β シグナル活性に与える影響
 - ⑤ Akt阻害剤投与による肺線維症に対する治療効果
 - ⑥ ヒト肺線維症症例における肺上皮*Pten*発現の検討
- ## 4. 研究成果

① 細気管支肺胞上皮における*Pten*の肺線維症発症制御

上皮における*Pten*の肺線維症発症制御に関する役割を*in vivo*で検証するために、細気管支肺胞上皮特異的*Pten*欠損マウス(KOマウス)と野生型マウス(WTマウス)に、ブレオマイシン(BLM, 0.05単位/匹)を気管内投与した。その結果、KOマウスはWTマウスと比較して低酸素血症(PaO₂:WT:101.5 \pm 6.4Torr, KO: 63.2 \pm 2.1 Torr, day14)により早期に死

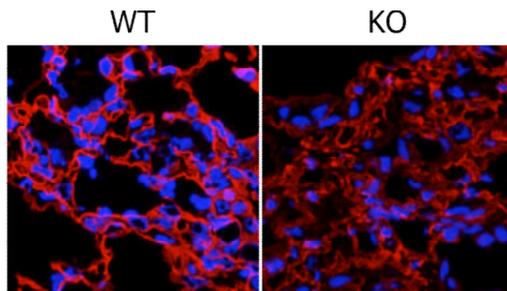


亡した($P < 0.001$)。組織学的に、KOマウスはWTと比較して著明な線維化による肺構築破壊を来していた(図)。さらに、細胞外マトリックスであるcollagen産生も、蛋白レベル並びにmRNAレベルでKOマウスが亢進していた。以上より、細気管支肺胞上皮における*Pten*の発現が肺線維症の病態制御に決定的

に重要であることを初めて明らかにした。

②細気管支肺胞上皮 Pten 発現の炎症細胞浸潤・基底膜破綻・肺線維芽細胞活性に与える影響

我々は細気管支上皮特異的 Pten 欠損マウスでの肺線維化増悪のメカニズムを解析した。BLM 投与 7 日後の WT マウスおよび KO マウスに対して気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、炎症細胞浸潤について評価した結果、両群に差はなかった。一方、気管支肺胞洗浄液の蛋白濃度および肺 wet/dry 重量比にて評価した肺血管透過性は、KO マウスにおいて亢進していた。抗 Laminin 抗体を用いた免疫染色の結果、KO マウスにおいて肺傷害後の基底膜破綻が亢進していることを見出した(図)。マウス肺より、線維芽細胞を初代培養し、肺線維芽細胞活性に与える影響を検討した結果、増殖能、アポトーシス抵抗性、遊走能および筋線維芽細胞への分化能ともに KO マウスにおいて亢進していた。以上より、我々は細気管支肺胞上皮での Pten の欠損が肺基底膜破綻の促進と肺線維芽細胞活性化を来し、肺線維化を進行させることを明らかにした。

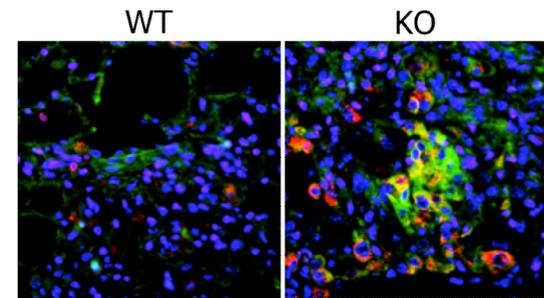


③上皮間葉形質転換 (EMT) に対する細気管支肺胞上皮 Pten 発現の役割

細気管支肺胞上皮特異的 Pten 欠損マウスでの肺線維化増悪における EMT の関与を検証するため、BLM 投与 14 日後の WT マウスと KO マウス肺を用い、II 型肺胞上皮細胞マーカー (SP-C) と筋線維芽細胞マーカー (α-SMA) の二重蛍光免疫染色を行った。その結果 KO マウスにおいて著明に double-positive cell が増加していた(図)。さらに、細気管支肺胞上皮特異的 Pten 欠損マウスと CAG-flxed Neo-EGFP マウスを交配し、細気管支肺胞上皮特異的に Pten 欠損かつ GFP でレポーターされるマウスを作成した。BLM 気管内投与 14 日後にマウス肺を摘出し、GFP と α-SMA の二重蛍光免疫染色を行った。その結果、WT マウスと比較して KO マウスにおいて肺上皮傷害後の EMT が著明に亢進していることを突き止めた。

④細気管支肺胞上皮 Pten 発現の TGF-β シグナル活性に与える影響

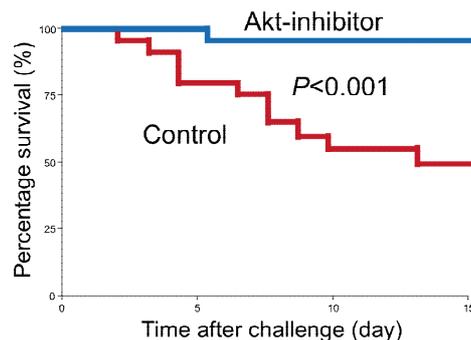
これまでに肺線維症発症制御に TGF-β シグナルが重要であることが報告されている。上



皮での Pten 欠損が与える TGF-β シグナル活性への影響を検討するため、BLM 投与 14 日後の WT マウスおよび KO マウスに対し BAL を行い、BAL 液中の活性型 TGF-β 測定ならびに TGF-β 下流分子 p-Smad2 の肺組織免疫染色を行った。結果、活性型 TGF-β 値には両群間に差はなかったが、核内移行 p-Smad2 陽性細胞は KO マウスにおいて著明に増加していた。次にヒト不死化肺上皮細胞株にレンチウイルスを用いて PTEN-WT, PTEN-DN 遺伝子を導入後、caveolin-1 の発現を検討した。その結果、PTEN-DN 遺伝子導入により、これまでに Smad-2 のリン酸化を阻害し Smad シグナルを阻害することが報告されている caveolin-1 発現の低下を認めた。以上より、上皮での Pten 発現が、caveolin-1 発現を介して肺上皮傷害後の TGF-β シグナル活性を制御し、肺線維症発症を制御していることが示唆された。

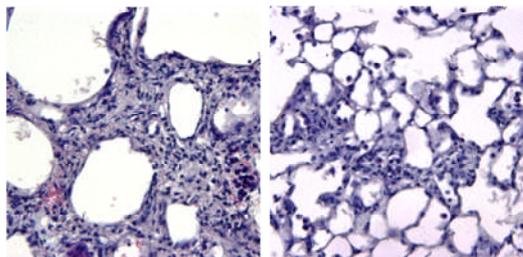
⑤ Akt 阻害剤投与による肺線維症に対する治療効果

次に、Akt 阻害剤による肺線維症抑制効果を検証するために、細気管支肺胞上皮特異的 Pten 欠損マウスに BLM を気管内投与後、投与当日より連日 Akt 阻害剤 (20mg/日/匹) を腹腔内投与した。その結果、control 群は生存率が 47%であったのに対し、Akt 阻害剤投与群の生存率は 95%にも上り、著明に予後が改善した ($P < 0.001$)。組織学的に、Akt 阻害剤投与により肺線維化による肺構築破壊は軽減しており、肺 collagen 含量も低下していた。これは現在有効な治療法のない肺線維症の克服に一石を投じる新規の知見である。Pten/Akt 経路が有望な分子標的に成り得ると大いに期待される。



control

Akt-inhibitor



⑥ ヒト肺線維症症例における肺上皮Pten発現の検討

最後に、ヒト肺線維症症例における肺上皮での PTEN の発現動態を検証するために、特発性肺線維症 (IPF) 群 (n=11) および対照群 (n=12) の肺組織を用いて、PTEN と TTF-1 (細気管支肺胞上皮マーカー) の二重免疫染色を行った。その結果、IPF 群は control 群と比較して有意に肺上皮での PTEN 発現が低下していた。さらに IPF 群において、IPF の予後規定因子とされる肺線維芽細胞巣 (Fibroblastic foci) 数と PTEN 発現上皮細胞数に逆相関を認めた。以上のことから、肺上皮細胞における PTEN 発現がヒト IPF 病態においても肺線維症の発症制御に重要な役割を有していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

① 三好かほり、柳 重久、今津善史、松元信弘、芦谷淳一、中里雅光：細気管支肺胞上皮特異的 Pten 欠損マウスを用いたブレオマイシン肺線維症モデルの解析. 第 49 回日本呼吸器学会総会、2009. 6、東京

② Tsubouchi H, Yanagi S, Miyoshi K, Imazu Y, Arimura Y, Matsumoto N, Ashitani J, Kawahara K, Suzuki A, Nakazato M: Function of PTEN/P13K/AKT pathway in bronchioalveolar epithelium in the pathogenesis of lung fibrosis. European Respiratory Society, 2009. 9, Vienna, Austria.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

受賞

2009 年 9 月

European Respiratory Society Annual Congress 2009

Cell & Molecular Biology Young Scientist Travel Award

“Function of Pten/PI3K/Akt pathway in bronchioalveolar epithelium in the pathogenesis of lung fibrosis”

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳 重久 (YANAGI SHIGEHISA)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：60404422

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：